



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอธิลีนจากดอกปทุมมา
(*Curcuma* spp.) ในสภาวะการเสื่อมสภาพของดอก
ETHYLENE BIOSYNTHETIC GENES IN PATUMA (*Curcuma* spp.)
FLOWERS IN RESPONSE TO SENESCENCE

โดย

รัฐพร จันทรเดช พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์

2551



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอธิลีนจาก
ดอกปทุมมา (*Curcuma* spp.) ในสภาวะการเสื่อมสภาพของดอก
ETHYLENE BIOSYNTHETIC GENES IN PATUMA
(*Curcuma* spp.) FLOWERS IN RESPONSE TO SENESCENCE

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550

จำนวน 300,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

รัฐพร จันทร์เดช

ผู้ร่วมโครงการ

พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

1 กันยายน 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2550 จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้



นายรัฐพร จันทร์เดช

นายพีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	จ
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	9
อุปกรณ์การวิจัย	10
วิธีการวิจัย	14
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	21
สรุปผลการวิจัย	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	31

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก acs gene และ aco gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-PCR	15
2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR	16
3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACS ในดอกปทุมมากับพืชชนิดอื่นๆ	23
4 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACO ในดอกปทุมมากับพืชชนิดอื่นๆ	26



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์เอธิลีน และการควบคุม	4
2. แสดงผลการสกัด Total RNA จากดอกปทุมมา	21
3 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ด้วย degenerated primer ของยีน ACS	22
4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของพืชชนิดต่างๆ	24
5 Phylogenic tree ที่สร้างขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของปทุมมากับพืชอื่นๆ 5 ชนิด	24
6 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ด้วย degenerated primer ของยีน ACO	25
7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน ACO ของพืชชนิดต่างๆ	26
8 Phylogenic tree ที่สร้างขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของยีน ACO ของปทุมมากับพืชอื่นๆ 5 ชนิด	27

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอธิลีนจากดอกปทุมมา
(*Curcuma* spp.) ในสภาวะการเสื่อมสภาพของดอก
ETHYLENE BIOSYNTHETIC GENES IN PATUMA (*Curcuma* spp.)
FLOWERS IN RESPONSE TO SENESCENCE

รัฐพร จันทรเดช¹, พิระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์²
RUTTAPORN CHUNDET¹, PRERAVUT WONGSAWAD²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

เอธิลีนเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆภายในพืช เช่น การเจริญ การพัฒนา และการเสื่อมสภาพ โดยขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์เอธิลีนคือการสร้าง S-adenosylmethionine (AdoMet) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase ทำการโคลนชิ้นส่วนของยีน ACC synthase และ ACC oxidase ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ mRNA จากส่วนของ bract ออกแบบ primers จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนดังกล่าวในพืชหลายชนิด และจากการตรวจสอบพบการแสดงออกของยีนในส่วน of bract และดอกเท่านั้น

คำนำ

ปทุมมา(*Curcuma* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นสะสมอาหารอยู่ใต้ดินแบบเหง้า ได้รับการส่งเสริมให้เป็นไม้ตัดดอกและไม้เก็บหัวพันธุ์เพื่อส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศที่สำคัญคือ เยอรมัน อเมริกา ญี่ปุ่น โปรตุเกส เนเธอร์แลนด์ อิตาลี และออสเตรเลีย มีมูลค่าส่งออกประมาณ 30 ล้านบาทต่อปี (สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2542) ทางภาครัฐมีแผนพัฒนาให้ได้พันธุ์ปทุมมาใหม่ๆ โดยเน้นคุณภาพผลผลิตและความเหมาะสมในการผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อขายผลผลิตป้อนตลาดโลกอย่างต่อเนื่อง

การศึกษาแนวทางยืดอายุปักแจกันและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้ พบว่าลักษณะการเสื่อมสภาพของช่อดอกปทุมมาที่พบคือ มีการเปลี่ยนสีบริเวณปลายเป็นสีน้ำตาล โคนก้านดอกสีระหว่างปักแจกันไม่ว่าในน้ำกลั่นหรือสารละลายเคมี ดอกย่อยที่บานมีการหายใจและการผลิตเอธิลีนในช่วงแรกต่ำ จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อดอกเริ่มเสื่อมสภาพ coma bract และดอกย่อยที่เป็นดอกตูมมีแนวโน้มการหายใจและการผลิตเอธิลีนสูงในวันแรกจากนั้นลดลงกลับกับเพิ่มขึ้นจนกระทั่งหมดอายุการใช้งาน ดอกปทุมมามีการเสื่อมสภาพเมื่อได้รับเอธิลีนจากภายนอก(กนกพร, 2541) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลกระทบต่อคุณภาพ และอายุการใช้งานของดอกปทุมมาทั้งสิ้นโดยเฉพาะการสร้างเอธิลีน เมื่อดอกเริ่มแก่ จะเร่งให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Apelbaun และ Katchansky, 1978 อ้างโดย มณีนี, 2544) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุง เพื่อรักษาคุณภาพของดอก และยืดอายุการใช้งานช่อดอกไม้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอซิลิน (ACC synthase และ ACC oxidase) ในระยะที่ดอกปทุมมาเกิดการเสื่อมสภาพ (senescence)
2. เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase ในระยะที่ดอกปทุมมาเกิดการเสื่อมสภาพ
3. เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน ACC synthase และ ACC oxidase
4. เพื่อการยืดอายุของดอกปทุมมาโดยเทคนิค sense และ antisense

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงแบบแผนการแสดงออก บทบาทและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์เอซิลิน ในระยะเสื่อมสภาพของดอกปทุมมาและใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาเพื่อยืดอายุในแจกัน (vase life)
2. สิ่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี peer review อย่างเข้มแข็ง
3. บัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท 1 คน
4. เกิดความร่วมมือระหว่างบุคลากรต่างสถาบันในการทำวิจัยที่ยั่งยืน

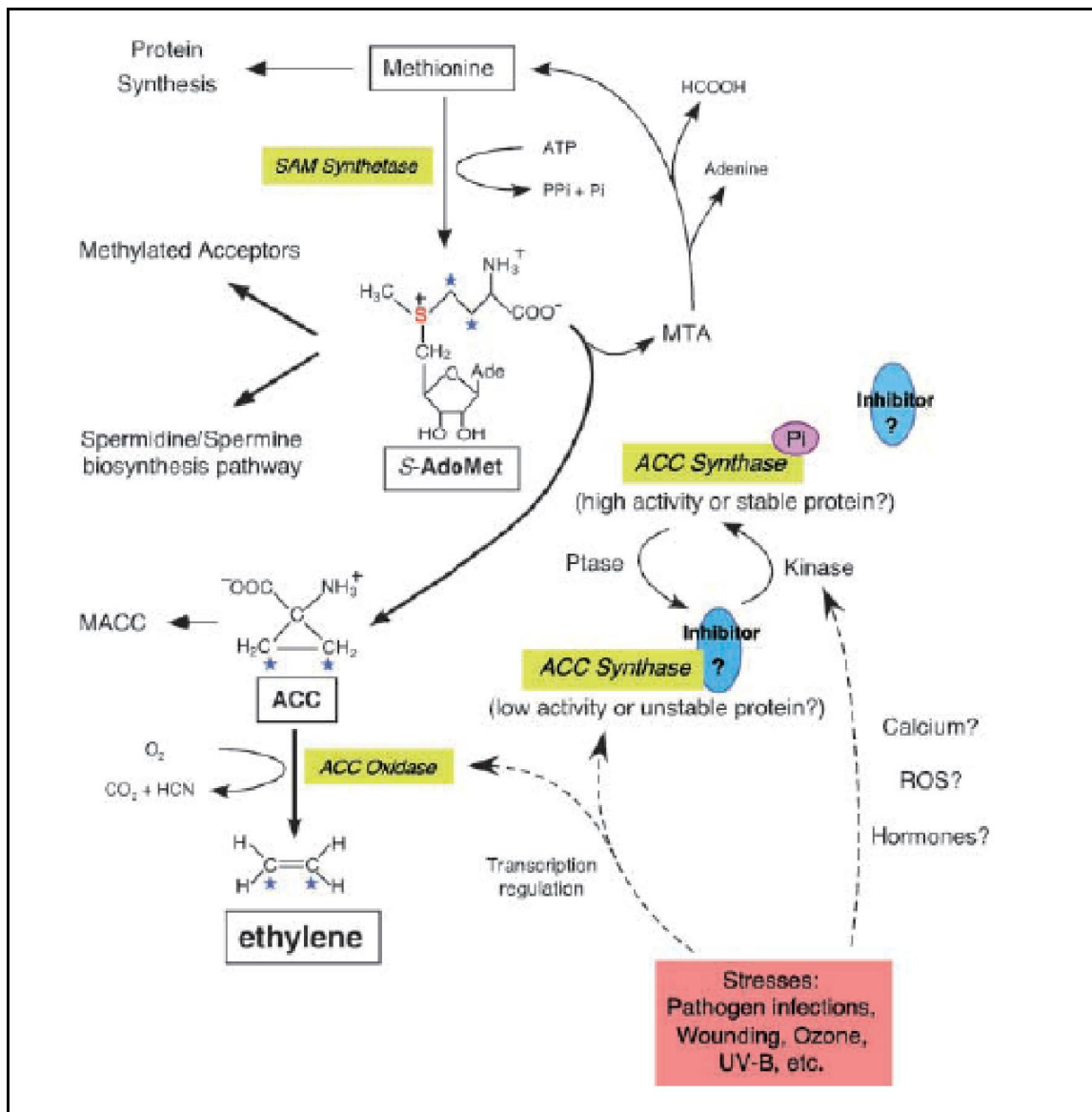
ตรวจเอกสาร

Ethylene

เอทิลีน เป็นฮอร์โมนพืชที่มีสถานะเป็นก๊าซ มีสูตรโมเลกุลเป็น C_2H_4 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28 ไม่มีสี มีกลิ่น ติดไฟได้ง่าย พบในธรรมชาติ สามารถที่จะถูก oxidised โดย ออกซิเจน โอโซน และต่างทัพบิม เอทิลีนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญต่างๆ เช่น การควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth and development) การงอกของเมล็ดพืช (germination of seeds) การออกดอก (flowering) การสุกแก่ของผลไม้ (fruit ripening) การตอบสนองต่อสภาวะเครียด (stress) ทั้งแบบ biotic และ abiotic เช่น ภาวะการขาดออกซิเจน (hypoxia) (Cohen and Kende, 1986) ภาวะแล้ง (drought) (Osborne, 1989) ภาวะที่เกิดจากการบุกรุกของจุลินทรีย์ (Toppan and Esquerre-Tugaye, 1984) และการเสื่อมสภาพของดอกไม้ (flower senescence) รวมทั้งการชักนำให้เกิดกลืนระหว่างกระบวนการสุกของผลไม้ (Mattoo and Suttle, 1991; Deikman, 1997) เป็นต้น

การสังเคราะห์เอทิลีน

การสังเคราะห์เอทิลีนในพืชชั้นสูง จะเริ่มจาก methionine ซึ่งเป็น amino acid ชนิดหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็น s-adenyl-methionine (AdoMet) โดยเอนไซม์ AdoMet synthetase จากนั้น AdoMet จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) โดยการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase (Adams and Yang, 1979) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการสังเคราะห์เอทิลีน ในขั้นสุดท้ายของการสังเคราะห์ เอทิลีน ACC จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนโดยเอนไซม์ ACC oxidase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์เอทิลีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่พืชมีการสะสมเอทิลีนในปริมาณสูง (Holdsworth *et al.*, 1988; Kim and Yang, 1994)



ภาพที่ 1 : แผนภาพแสดงการสังเคราะห์เอทิลีน และการควบคุม

ที่มา: <http://www.hos.ufl.edu/kleeweb/5306%20assigned%20papers/Reviews/>

ethylene.pdf

การกำหนดการผลิตเอทิลีน (Brady and Speirs, 1991)

ในผลไม้ส่วนใหญ่ มีการผลิตเอทิลีนมากขึ้นเมื่อมี ACC เพิ่มขึ้น ซึ่งในกรณีนี้การผลิตเอทิลีนถูกกำหนดโดยอัตราการสังเคราะห์ ACC โดยกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase แต่ในผลไม้บางชนิด ในระยะพัฒนาการเพิ่มขึ้นของ ACC ไม่มีผลในการเพิ่มการผลิตเอทิลีนโดยคาดว่าในเนื้อเยื่อมี ethylene-forming enzyme(EFE) ไม่เพียงพอที่จะใช้ประโยชน์จาก ACC ที่เพิ่มขึ้น โดยปกติความเข้มข้นของ ACC เพิ่มขึ้นอย่างมากในผลที่สุกจัด ทำให้รู้ว่าการสังเคราะห์ ACC มีมากกว่าอัตราการใช้ประโยชน์โดย EFE การสังเคราะห์เอทิลีนในผลไม้อาจถูกกำหนดโดย ACC synthase หรือกิจกรรมของ EFE หรือทั้งสองอย่าง แต่ ACC synthase มีความสำคัญมากกว่า EFE ใน metabolic pathway และเกิดการสะสมอย่างรวดเร็วเมื่อการสังเคราะห์เอทิลีนถูกกระตุ้น และเสื่อมสลายอย่างรวดเร็วเมื่อถูกขัดขวาง ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นของเอนไซม์ควบคุม

การตอบสนองของดอกไม้ต่อเอทิลีน (นิธิยาและदनัย, 2537)

ดอกไม้แต่ละชนิดตอบสนองต่อเอทิลีนในระดับความไวที่แตกต่างกัน เมื่อเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพจะมีความไวต่อการตอบสนองเอทิลีนเพิ่มขึ้น เป็นที่คาดกันว่าความไวต่อการตอบสนองต่อเอทิลีนขึ้นอยู่กับปริมาณของ receptor ที่เฉพาะในเนื้อเยื่อ ดอกไม้บางชนิดมีการตอบสนองต่อเอทิลีนได้สูงที่ความเข้มข้นของเอทิลีน 1-3 ppm. ในเวลา 24 ชั่วโมง ดอกไม้ชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันมีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีนไม่เท่ากัน และมีลักษณะความเสียหายแตกต่างกัน ผลกระทบของเนื้อเยื่อดอกไม้ต่อการทำงานของเอทิลีนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ของความเข้มข้นของเอทิลีน ความเข้มข้นของเอทิลีนในเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาซึ่งเป็นสัญญาณควบคุม (controlling signal) และสามารถบ่งชี้ได้โดยวัดอัตราการสังเคราะห์เอทิลีน ศึกษาเมแทบอลิซึม และวัดอัตราการแพร่กระจายของเอทิลีนไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ และบริเวณภายนอกดอก

การผลิตเอธิลีนและการเสื่อมสภาพของดอกไม้

ปรากฏการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายละอองเรณูของดอกไม้หลายชนิด คือ การผลิตเอธิลีนเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก การเสื่อมสภาพ หลุดร่วงของอวัยวะต่างๆ ของดอกไม้ การเจริญและพัฒนาของรังไข่ (O'Neill, 1997)

Nichols (1966 อ้างโดย มณีนี, 2544) พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอธิลีน มีผลต่อการเสื่อมสภาพของดอกคาร์เนชั่น โดยเริ่มสังเคราะห์เอธิลีน ในช่วง 20-40 วันหลังดอกบาน ดอก *Cyclamen persicum* พันธุ์ Mill ที่ไม่ได้รับการถ่ายละอองเรณูมีการผลิตเอธิลีนในปริมาณต่ำจนกระทั่งดอกเหี่ยว แต่ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอธิลีนอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการถ่ายละอองเกสรภายในเวลา 4 วัน (Halevy et al., 1984)

กล้วยไม้ตระกูลหวายสายพันธุ์ Pompadour มีการผลิตเอธิลีนสูงสุดหลังดอกบานเต็มที่ 3 สัปดาห์ และสัมพันธ์กับการสะสมสาร ACC ที่ตรวจวัดได้ในเนื้อเยื่อส่วนดอก ทำให้เกิดการม้วนงอของกลีบดอกและเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพ เมื่อให้สาร ACC จากภายนอกขณะที่ดอกบานเต็มที่ทำให้เร่งการเสื่อมสภาพ และการร่วงของดอกกล้วยไม้ให้เร็วขึ้น (Nair และ Tung, 1987)

Itzhaki และคณะ (1994 อ้างโดย มณีนี, 2544) ได้โคลนยีน *glutathione-S-transferase* (*GST1*) ของดอกคาร์เนชั่นในระหว่างการศึกษาการเสื่อมสภาพ และศึกษา DNase I footprinting พบว่าตำแหน่งที่ 5' flanking region ของยีน *GST1* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5' GTG ATT TAC CAC CTA TTT CAA G 3' เป็นตำแหน่งที่เข้ามาเกาะของโปรตีนที่แยกได้ในช่วงที่กลีบดอกกำลังเสื่อมสภาพ และดอกที่ได้รับเอธิลีน Maxon และ Woodson (1996) ได้โคลนยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน *camation ethylene responsive element binding protein* (CEBP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะกับปลาย 5' flanking region ของยีน *GST1* และแสดงออกที่บริเวณกลีบดอก ก้านชูเกสรตัวเมีย และรังไข่ โดยปริมาณของ mRNA ที่สะสมจะลดลงเมื่อกลีบดอกเกิดการเสื่อมสภาพ

ดอกกล้วยไม้หวายปอมปาด้วที่ได้รับการผสมเกสรเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว สามารถสังเกตเห็นได้หลังผสมเกสรประมาณ 15 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase และปริมาณ

ของ ACC ในส่วนของเส้นใยรวมกับก้านดอกย่อยเพิ่มขึ้นมากกว่าในส่วนของกลีบ
ดอกรวมกับกลีบเลี้ยง และการผสมเกสรยังทำให้ดอกกล้วยไม้มีความไวต่อเอธิลีนเพิ่มขึ้น เป็นสาเหตุ
ทำให้ดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์เกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้รูปแบบการผลิตเอธิ
ลีนยังแตกต่างกันโดย ACC ทำให้ดอกผลิตเอธิลีนเพิ่มขึ้นในระยะแรกๆ หลังการผสมเกสรเท่านั้น แต่
เอธิลีนที่เกิดจากการผสมเกสรนั้นเกิดช้ากว่าและมีอัตราการผลิตมากกว่า และต่อเนื่องนานกว่า
(อดิเรก, 2540)

การแสดงออกของยีน ACC oxidase และ ACC synthase ในดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอป
ซิส พบว่าการถ่ายละอองเรณูชักนำการสร้างเอธิลีนในยอดเกสรเพศเมียและรังไข่ของกล้วยไม้สกุลฟา
แลนนอปซิสมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase ทำให้เกิดการ
สังเคราะห์เอธิลีนแบบ autocatalytic เพิ่มขึ้นภายใน 12-14 ชั่วโมง ทำให้แผ่นปากม้วนงอ เกิดการ
เสื่อมสภาพของกลีบดอกภายในเวลา 2 วัน (มณีนี, 2544)

1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS)

Oeller และคณะ (1991) ใช้เทคนิคการถ่ายยีน antisense RNA ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์
ACC synthase ในมะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสังเคราะห์เอธิลีนลดลง 99.5%
ตรวจพบการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase หลังจากได้รับการผสมเกสรและ
ในระหว่างเกิดการเสื่อมสภาพของกลีบดอกมะเขือเทศ (Immaculada et al., 2000)

มีการศึกษาในที่ควบคุมการสังเคราะห์ ACC synthase ในพืชหลายชนิด ตั้งแต่การโคลน
ยีน ACC synthase โดยการสร้าง cDNA library จาก zucchini (*Cucurbita*) ผลมะเขือเทศ แตง แอป
เปิ้ล คาร์เนชั่น ถั่วเขียว และ Arabidopsis พบว่าพืชต่างๆ เหล่านี้มียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ ACC
synthase ที่แตกต่างกัน แสดงว่ายีน ACC synthase เป็น family gene คือมียีนมากกว่า 1 ยีน ที่
กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC synthase และมีการแสดงออกเมื่อได้รับสัญญาณกระตุ้น (signal)
ต่างๆ เช่น การได้รับสารจากภายนอก(เอธิลีน, cycloheximide, indoleacetic acid, cyanide, lithium
chloride และ ozone) การเกิดบาดแผล(wounding) (Kevin L. et al., 2002)

กล้วยไม้หวายพันธุ์ชาริดิพลอยด์ (2N) มีอัตราการผลิตเอธิลีนมากกว่าดอกกล้วยไม้หวายเตตราพลอยด์ (4N) ดอกตูมมีการผลิตเอธิลีนสูงสุด ซึ่งอัตราการผลิตเอธิลีนมีความสัมพันธ์กับปริมาณ ACC และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase เมื่อให้สารละลาย ACC จากภายนอกพบว่าอัตราการผลิตเอธิลีนมากกว่าดอกที่ได้รับน้ำกลั่น และเมื่อให้สารละลาย AOA ซึ่งเป็นสารยับยั้งการผลิตเอธิลีนทำให้อัตราการสร้างเอธิลีน ปริมาณ ACC และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase (อภิวิรา, 2542)

การศึกษาการแสดงออกทำให้รู้ว่าการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ ACC synthase mRNAs ในระหว่างเกิดการเสื่อมสภาพของดอกและหลังจากการผสมเกสร รวมทั้งการได้รับสิ่งเร้า เช่น ออกซิน LiCl ในดอกคาร์เนชั่น การแสดงออกของ DCACS2 และ DCACS3 เกิดขึ้นก่อนที่เกสรตัวเมีย ขณะที่ DCACS1 มีความเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของกลีบดอกที่ควบคุมโดยเอธิลีน ซึ่งทั้ง 3 ยีนมีความคล้ายคลึงกับยีน ACC synthase ที่แยกได้จาก Arabidopsis มะเขือเทศ และถั่ว mung bean (Michelle L. and William R., 1999)

มณีนี และคณะ (2544) ศึกษาการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน ACC oxidase และ ACC synthase ในกล้วยไม้พบว่าบางส่วนของ ACC oxidase มีขนาด 365 เรซิดิว และ ACC synthase ที่สมบูรณ์ขนาด 445 เรซิดิว โดย ACC oxidase ของออนทิดีมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับกล้วยไม้สกุล Doritaenopsis และกล้วยไม้สกุลหวายคิดเป็นร้อยละ 81 และ 79 ตามลำดับ และ ACC synthase มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดเดียวกันของกล้วยและข้าวสาลีคิดเป็นร้อยละ 68 และ 64 ตามลำดับ

ACC oxidase (ACO)

Wim H. และคณะ (1999) พบว่าออกซิเจนที่ระดับต่ำจะทำให้ระดับของ ACC oxidase mRNAs เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ระดับของ ACC oxidase protein เพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าโปรตีนนี้จะทำงานได้น้อยเมื่อระดับออกซิเจนต่ำ การสร้างเอธิลีนของ *Rumex palustris* ในขณะที่ทำการแช่ในน้ำถูกควบคุมโดยระดับของเอนไซม์ ACC oxidase ที่เพิ่มขึ้นเพื่อถ่วงดุล (counterbalance) กับการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ และการแสดงออกของยีน RP-ACO1 จะพบในก้านใบที่มีการยึดตัวของเนื้อเยื่อขณะแช่อยู่ใน

น้ำถาวรยศ และคณะ (ม.ป.ป.) ทำการโคลนยีน *ACC oxidase (ACO)* และ *Ethylene receptor (ETR)* ในกล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้า โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิดจากเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) พบว่ายีน *ACO* ที่สังเคราะห์ได้จากส่วนอนุรักษ์มีขนาด 800 คู่เบส ดีเอ็นเอที่โคลนได้มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกล้วยไม้สกุลไดริแทนอปซิส และฟาแลนนอปซิสคิดเป็น 90% และมีการแสดงออกที่ปากดอก ยีน *ETR* มีขนาด 900 คู่เบส ดีเอ็นเอที่โคลนได้มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม และฟาแลนนอปซิสคิดเป็น 84% และ 83% ตามลำดับ

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

เวลา	เริ่มดำเนินการ	เดือน ตุลาคม 2549
	เสร็จสิ้น	เดือน กันยายน 2550
สถานที่	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	

อุปกรณ์การวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ (*Curcuma* spp.)

2. วัสดุและอุปกรณ์

- 2.1 เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 37 °C (Memmert, Germany)
- 2.3 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 2.4 Adjustable automatic pipette และ white, yellow และ blue tip
- 2.5 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ,Multi Ultra PCR tube (Sorenson Bioscience, Inc., U.S.A.) และ centrifuge tube
- 2.6 เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
- 2.7 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอน (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.8 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอนตั้ง (Sequi-Gen[®] GT, Sequencing cell ; (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply; (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.10 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.11 เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer)
- 2.12 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- 2.13 เครื่องเขย่า (shaker)
- 2.14 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
- 2.15 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ 4 °C, -20 °C และ -80 °C
- 2.16 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
- 2.17 เครื่อง electroporater
- 2.18 คิวเวต (cuvette)
- 2.19 เครื่องผสม (vortex)
- 2.20 เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)

- 2.21 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.22 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- 2.23 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
- 2.24 ชุดโม่บดตัวอย่าง (mortar and pestle)
- 2.25 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) เพลท (plate) spreader ฯลฯ
- 2.26 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ซ้อนดักสาร กระดาษขึงสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipe tissue) ฟลอยด์อะลูมิเนียม ถังพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระดาษพาราฟิล์ม ปากคีบ ถังมือ กล่องโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ถาดพลาสติกกันตื้น ฯลฯ
- 2.27 กล้องดิจิทัล

3. สารเคมี

- 3.1 Liquid nitrogen
- 3.2 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)
- 3.3 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferment, U.S.A.)
- 3.4 QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.)
- 3.5 Inst/Aclone[™] PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A.)
- 3.6 Sodium chloride (NaCl)
- 3.7 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
- 3.8 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)
- 3.9 Chloroform
- 3.10 Isopropanal
- 3.11 Ethyl alcohol (EtOH)
- 3.12 RNaseONE[™] ribonuclease (Promega, U.S.A.)
- 3.13 PCR buffer (Fermentas, U.S.A.)

- 3.14 Magnesium chloride (MgCl_2) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.15 Deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTPs) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.16 Primers (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
- 3.17 Taq DNA polymerase (Fermentas, U.S.A.)
- 3.18 GeneRulerTM 100bp DNA Ladder (Fermentas, U.S.A.)
- 3.19 Ampicillin
- 3.20 Glycerol oil
- 3.21 Restriction enzyme (*EcoRI*; Fermentas, U.S.A.)
- 3.22 pGEM[®] T Easy Vector (Promega, U.S.A)
- 3.23 T4 DNA Ligase (Sigma, U.S.A.)
- 3.24 Ligase Buffer (Promega, U.S.A)
- 3.25 Deionize H_2O (dH_2O)
- 3.26 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.27 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.28 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.29 Potassium acetate
- 3.30 Bromophenol blue
- 3.31 Xylene cyanol FF
- 3.32 Sucrose
- 3.33 Boric acid
- 3.34 Tris base
- 3.35 Ethidium bromide
- 3.36 Agarose
- 3.37 Agar
- 3.38 Tryptone
- 3.39 Yeast extract

- 3.40 Dideoxyribonucleotide triphosphate (d/ddNTPs) (Promega, U.S.A.)
- 3.41 DNA sequencing 5X buffer (Promega, U.S.A.)
- 3.42 Ultrapure water
- 3.43 DNA sequencing Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
- 3.44 DNA Sequencing Stop Solution (Promega, U.S.A.)
- 3.45 Acrylamide
- 3.46 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
- 3.47 Urea
- 3.48 3-(Trimethoxysilyl),propylmethacrylate (Bind Silane) (sigma, U.S.A.)
- 3.49 Clear view (Dietham Trading Co.,Ltd, Thailand)
- 3.50 Ammonium persulphate (APS)
- 3.51 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)(BIO-RAD, U.S.A)
- 3.52 Glacial acetic acid
- 3.53 Silver nitrate (AgNO_3)
- 3.54 37% Formaldehyde (HCHO)
- 3.55 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 3.56 Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- 3.57 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)
- 3.58 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)
- 3.59 N,N'-dimethyl-formamide

วิธีการวิจัย

วิธีการทดลอง การทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

1. การเตรียมอาร์เอ็นเอทั้ง หหมด (total RNA)

1.1. การเตรียมตัวอย่าง พืชทดลอง

นำกลีบดอกของ ปทุมมา มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างใน aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.2. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง หหมด (total RNA)

1.2.1. นำตัวอย่าง ที่บดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี TRIzol[®] Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่าง กับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

1.2.2. เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นาน 15 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที

1.2.3. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ แล้วจึง ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

1.2.4. เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับไปมา จากนั้น ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

1.2.5. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของ ตะกอน หลัง จากนั้นล้างตะกอน โดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$

1.2.6. นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้ง โดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (RNase-free water) ปริมาตร 20 μl

1.2.7. ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้ง หหมดด้วย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA

2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid™ First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A.)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 μ g , oligo(dT)₁₈ primer 0.5 μ g และ deionized water ให้ครบ 12 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1xreaction buffer, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และเติม dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 5 นาที จากนั้นเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42°C นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาที เก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -70°C

3. การสังเคราะห์ 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene (*acs*) และ 1-aminopropane-1-carboxylate oxidase gene (*aco*) ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบ Primer โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ (Conserved domain) ของ *acs* gene และ *aco* gene จาก Dianthus, Fragaria, Cymbidium, Ipomoea, Petunia, Lilium, Prim.cons. แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก *acs* gene และ *aco* gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
ACS Forward primer*	AT(TCA) CA(AG) ATG GG(TCAG) TT(AG)/CT(TCAG) GC(TCAG) GA(AG) AA(CT) CA(AG)
ACS Reverse primer*	AT(TC) TC(TCAG) TG(TC) AT(TC) CC(TCAG) TT(AG)/CT(TCAG) GG(TCAG) AT(TCAG)
ACO Forward primer*	GCTTGTSARAA YTG GGGYTTSTWYG
ACO Reverse primer*	CATCGCCTCRAAYCKYGGYTCYTT

* สังเคราะห์โดยบริษัท Operon Technology, Alamada, U.S.A

3.2. องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM MgCl₂, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 μ M, ไพรเมอร์ 0.5 μ g, Taq DNA polymerase 2.5 Unit/reaction และ 1 st cDNA (DNA template) 40 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionize water จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณ 1 st cDNA ด้วยเครื่อง PCR

3.3. เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT- PCR แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

อุณหภูมิ	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	4°C
ระยะเวลา	2min	15 sec	15 sec	30 sec	10 min	α
จำนวนรอบ	← 30 รอบ →					

3.4 การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

3.4.1 เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1xTBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°C ทำความสะอาดถาดเจล และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก

3.4.2. วาง หัวเสียบลง ที่ปลายด้านหนึ่งของ ถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ

3.4.3 เท agarose ลง ในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจล แข็งตัว

3.4.4 เททับผิวหน้าของ เจลด้วย 1xTBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหัวเสียบออก

3.4.5 นำเอา agarose gel ออกจากบล็อกแล้ววางลาดลง ในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หัวเสียบอยู่ทางซ้าย

3.4.6 เท 1xTBE buffer ลง ในอ่าง ให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1xTBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

3.4.7 ผสม 1 x loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการ การตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของ agarose gel

3.4.8 ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากซ้ายไปขวา ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.4.9 ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้น ย้ายไปแช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน

3.4.10 นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้

3.4.11 ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ การโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก (elute)

3.5 การ clone ชิ้นส่วน *acs* gene และ *aco* gene (pGEM-T-Easy, Promega)

3.5.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อก (ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 μ l ประกอบด้วย plasmid vector pGEM-Teasy (ภาคผนวก) 0.165 μ g, purified PCR fragment 0.54 pmol, 1xligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22°C นาน 12 ชั่วโมง

3.5.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™ Bacterial Transformation System

- 3.5.3 เตรียม *E.coli* สายพันธุ์ DH5- α โดยเลี้ยง เซลล์ใน TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 ml จากนั้นเขย่าที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง
- 3.5.4 เติมน้ำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยง 12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™ C-Medium จากนั้นปั่นที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
- 3.5.5 ปั่น LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 °C อย่าง น้อย 20 นาที
- 3.5.6 เตรียม TransformAid™ T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ในปริมาตร 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™ T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง
- 3.5.7 เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยง ไว้ 20 นาทีโดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และ นำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที
- 3.5.8 ทิ้ง ส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 300 μ l จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- 3.5.9 centrifuge เซลล์อีกครั้ง ที่ความเร็วสูง สุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส
- 3.5.10 resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 120 μ l จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- 3.5.11 เตรียม ligation mixture โดยแบ่ง ใส่ eppendorf ขนาด 1.5 ml หลอดละ 15 μ l และวางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที
- 3.5.12 เติมน้ำเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 60 μ l ในแต่ละหลอดของ ligation Mixture จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- 3.5.13 Plate เซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นปั่น เซลล์ที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

3.6 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

3.6.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline (T.Maniatis et., al 1982)

- 3.6.1.1 เลือกโคโลนีสีขาวจาก LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยเลี้ยง ใน LB-Ampicillin both ที่ 37 °C เขย่านาน 12 ชั่วโมง

3.6.1.2 นำเชื้อ 1.5 ml ใส่ลงใน microtube ปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่ซึ่ง ส่วนใสเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์

3.6.1.3 นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l และกลับหลอดไปมาเบาๆ 4 ครั้ง และเติม solution III (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 μ l เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นตะกอนสีขาวๆ เกิดขึ้นแช่ต่อน้ำแข็งอีก 10 นาที

3.6.1.4 นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บ ส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส

3.6.1.5 ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที และแยกเอาตะกอนพลาสติกมาละลายด้วย 0.05 M Tris, 0.1 M NaOAc (pH 8)

3.6.1.6 เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของ ปริมาตรน้ำใส เขย่าให้ เข้ากันนำไปไว้ที่ -20°C นาน 30 นาที และปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที

3.6.1.7 ที่ซึ่งส่วนใส และนำตะกอนพลาสติกด้านล่าง ด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 μ l จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 5 นาที

3.6.1.8 นำตะกอนพลาสติกมาทำให้แห้ง โดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 μ l

3.6.1.9 ตรวจสอบพลาสติกโดยการทำ agarose gel electrophoresis

3.6.2 การตรวจสอบพลาสติกโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ซึ่งประกอบด้วย 1x EcoRI buffer, plasmid 2 μ g, เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI 15 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย sterile water จากนั้นนำไป บ่มที่ 37°C นาน 12 hr ตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับแทปดีเอ็นเอมาตรฐาน (Molecular Marker)

4. การสร้างและส่งถ่ายชุดยีนเข้าสู่ปทุมมาและยาสูบ

4.1 ย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase เข้าสู่ Ti plasmid (pBI121 หรือ p35S GFP) โดยเวกเตอร์ จะมี marker gene คือ *gus* และ *gfp* ภายใต้การทำงานของ 35S promoter ในทิศทาง sense และ antisense ตามลำดับ

4.2 ส่งถ่าย recombinant plasmids จากข้อ 14.3.1 เข้าสู่เนื้อเยื่อของต้นยาสูบและปทุมมาโดยวิธี Agrobacterium-mediated transfer (Raineri et al., 1990)

4.3 คัดเลือก transgenic plants ในระยะแรกโดยคัดเลือกจากการแสดงออกของ antibiotic resistance genes แล้วชักนำให้ เป็นต้นอ่อนโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้น ตรวจสอบการแสดงออกของ *gus* และ *gfp* gene และเทคนิค PCR

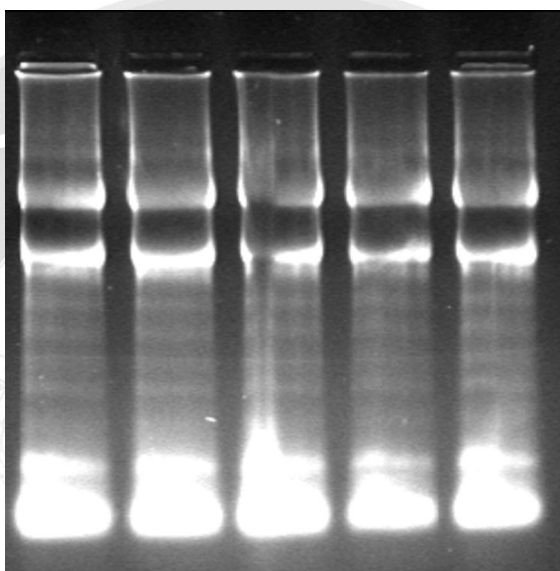
4.4 ตรวจสอบการเข้าร่วมของ gene ที่สังเคราะห์ ACC synthase และ ACC oxidase ใน จีโนมของยาสูบและปทุมมาโดยวิธี RT-PCR

4.5 ชักนำให้ transgenic plant เกิดเป็นต้น แล้วติดตามดูผลของยีนที่แสดงออก (phenotype)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การสกัด Total RNA จากดอกปทุมมาโดยใช้ TRIZOL[®] Reagent

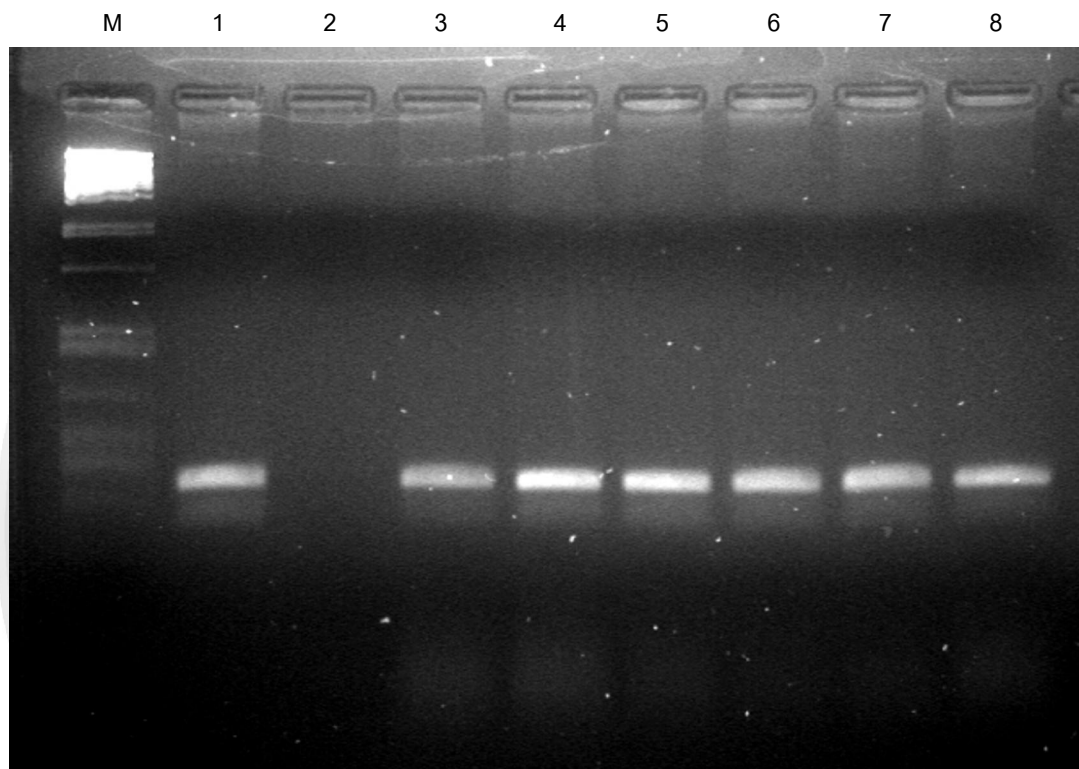
ผลการแยก RNA จากดอกและใบปทุมมาที่สกัดได้ โดยวิธี Agarose gel Electrophoresis ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 : แสดงผลการสกัด Total RNA จากดอกปทุมมา

2. การแยก 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene (acs gene) ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน ACS จากเอ็มอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบ และดอกปทุมมาที่ไม่ถูกตัดและที่ถูกตัดออกจากต้นในระยะ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ชั่วโมง พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 492 คู่เบส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 : แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ด้วย degenerated primer ของยีน ACS

M: Lamda DNA/*Pst*I, 1,3-8: ชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ mRNAs template จากดอกปทุมมาที่ตัดออกจากต้นที่ชั่วโมงที่ 0 1 2 3 4 5 และ 10 ตามลำดับ, 2: ชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ mRNAs template จากใบปทุมมา

3. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS จากปทุมมากับฐานข้อมูล Genbank ยีน ACS ที่แยกได้มีกรดอะมิโน 164 กรดอะมิโน ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้

Amino acid Sequence

IQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNP KASICTNDGIESFRRIANFQDYH
GLPEFTNAIAKFMEKTRGVKVKF DAKRVVMAGGATCANETLILCL
ADPADAFLVPTPYYPGFNRDLRWRSGVQLLPISCKSCNNFKITIE
AIEEAYEKGQQANVKIKGLILTNP CNPLGT

นำลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของปทุมมามาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast P ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 : การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACS ในดอกปทุมมากับพืชชนิดอื่นๆ

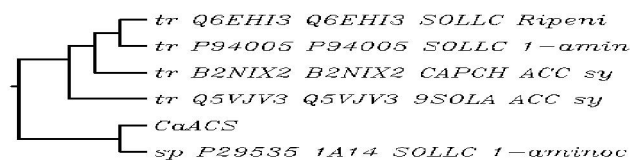
Accession #	Plant species	Amino acid size	%Amino acid similarity
P29535	<i>Lycopersicon esculentum</i>	476	98
B2NIX2	<i>Capsicum chinense</i>	486	77
Q5VJV3	<i>Nicotiana attenuata</i>	490	77
Q6EHI3	<i>Solanum lycopersicum</i>	485	76
P94005	<i>Solanum lycopersicum</i>	477	76

และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของปทุมมากับยีน ACS ของพืชห้าชนิดมาเปรียบเทียบกัน ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่ามีความคล้ายคลึงกันโดยเฉพาะบริเวณอนุรักษ์ (conserve domains) ของยีนดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของพืชชนิดต่างๆ

CaACS	---IQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNPKASICTNDGIESFRRIANFQDYHG
sp P29535 1A14_SOLLC	NGVIQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNPKASICTNDGIESFRRIANFQDYHG
tr B2NIX2 B2NIX2_CAPCH	NGVIQMGLAENQLCFDLIEEWIKRNPKASICSNEGKSFKAIANFQDYHG
tr Q5VJV3 Q5VJV3_9SOLA	NGVIQMGLAENQLCFDLIEEWIKRNPNASICTTTEGIKSFRAIANFQDYHG
tr Q6EHI3 Q6EHI3_SOLLC	NGVIQMGLAENQLCLDLIEDWIKRNPKGSI-CS-EGIKSFKAIANFQDYHG
tr P94005 P94005_SOLLC	NGVIQMGLAENQLCLDLIEDWIKRNPKGSI-CS-EGIKSFKAIANFQDYHG
	*****.*****:*****:*****:*****:*****
CaACS	LPEFTNAIAKFMEKTRGVKVFDAKRVVMAGGATCANETLILCLADPADA
sp P29535 1A14_SOLLC	LPEFTNAIAKFMEKTRGGKVKFDKRVVMAGGATGANETLILCLADPADA
tr B2NIX2 B2NIX2_CAPCH	LPEFRRAIAKFMEKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANESIIIFCLADPADA
tr Q5VJV3 Q5VJV3_9SOLA	LPEFRRAIAKFMEKTRGERVTFDPERVVMAGGATGANETIIIFCLADAGDA
tr Q6EHI3 Q6EHI3_SOLLC	LPEFRKAIKFMEKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANETIIIFCLADPADA
tr P94005 P94005_SOLLC	LPEFRKAIKFMEKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANETIIIFCLADPADA
	****.*****:* **.:***** ***:**:*:*****..**
CaACS	FLVPTPYYPGFNRDLRWRSQVQLLPISCKSCNNFKITIEAIEEAYEKQQ
sp P29535 1A14_SOLLC	FLVPTPYYPGFNRDLRWRSQVQLLPISCKSCNNFKITIEAIEEAYEKQQ
tr B2NIX2 B2NIX2_CAPCH	FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFQITAKAVKEAYENAQK
tr Q5VJV3 Q5VJV3_9SOLA	FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIPCDSSNNFQITTKAVNEAYENAQK
tr Q6EHI3 Q6EHI3_SOLLC	FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFKITSKAVKEAYENAQK
tr P94005 P94005_SOLLC	FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFKITSKAVKEAYENAQK
	****:****.*****:*****.*.*.***:***:***:****:..**
CaACS	ANVKIKGLILTNPCNPLGT-----
sp P29535 1A14_SOLLC	ANVKIKGLILTNPCNPLGTILDRDTLKKISTFTNEHNIHLVCDEIYAATV
tr B2NIX2 B2NIX2_CAPCH	SNIKVKGLILTNPSNPLGTLDKHTLKSLLNFTNQHNHLVCDEIYAATV
tr Q5VJV3 Q5VJV3_9SOLA	SNIKVKGLILTNPSNPLGTLDRTDLKNEFTFTNQHNHLVCDEIYAATV
tr Q6EHI3 Q6EHI3_SOLLC	SNIKVKGLILTNPSNPLGTLDKDTLKSVLSTFTNQHNHLVCDEIYAATV
tr P94005 P94005_SOLLC	SNIKVKGLILTNPSNPLGTLDKDTLKSVLSTFTNQHNHLVCDEIYAATV
	:*:***:*****.*****

เมื่อจัดกลุ่มเพื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของยีน ACS โดยสร้างเป็น Phylogenic tree (ภาพที่ 5) พบว่ายีน ACS ของปทุมมามีความใกล้ชิดกับยีน ACS ของมะเขือเทศมากที่สุด



ภาพที่ 5 Phylogenic tree ที่สร้างขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของยีน ACS ของปทุมมากับพืชอื่นๆ

5 ชนิด



บทนำ

ปทุมมา(*Curcuma* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นสะสมอาหารอยู่ใต้ดินแบบเหง้า ได้รับการส่งเสริมให้เป็นไม้ตัดดอกและไม้เก็บหัวพันธุ์เพื่อส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศที่สำคัญคือ เยอรมัน อเมริกา ญี่ปุ่น โปรตุเกส เนเธอร์แลนด์ อิตาลี และออสเตรเลีย มีมูลค่าส่งออกประมาณ 30 ล้านบาทต่อปี (สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2542) ทางภาครัฐมีแผนพัฒนาให้ได้พันธุ์ปทุมมาใหม่ๆ โดยเน้นคุณภาพผลผลิตและความเหมาะสมในการผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อขยายผลผลิตป้อนตลาดโลกอย่างต่อเนื่อง

การศึกษาแนวทางยืดอายุปักแจกันและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้ พบว่าลักษณะการเสื่อมสภาพของช่อดอกปทุมมาที่พบคือ มีการเปลี่ยนสีบริเวณปลายเป็นสีน้ำตาล โคนก้านดอกลีบระหว่างปักแจกันไม่ว่าในน้ำกลั่นหรือสารละลายเคมี ดอกย่อยที่บานมีการหายใจและการผลิตเอทิลีนในช่วงแรกต่ำ จากนั้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อดอกเริ่มเสื่อมสภาพ coma bract และดอกย่อยที่เป็นดอกตูมมีแนวโน้มการหายใจและการผลิตเอทิลีนสูงในวันแรกจากนั้นลดลง สลับกับเพิ่มขึ้นจนกระทั่งหมดอายุการใช้งาน ดอกปทุมมามีการเสื่อมสภาพเมื่อได้รับเอทิลีนจากภายนอก(กนกพร, 2541) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีผลกระทบต่อคุณภาพ และอายุการใช้งานของดอกปทุมมาทั้งสิ้นโดยเฉพาะการสร้างเอทิลีน เมื่อดอกเริ่มแก่ จะเร่งให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Apelbaun และ Katchansky, 1978 อ้างโดย มณีนี, 2544) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุง เพื่อรักษาคุณภาพของดอก และยืดอายุการใช้งานของดอกไม้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอซีลิน (ACC synthase และ ACC oxidase) ในระยะที่ดอกปทุมมาเกิดการเสื่อมสภาพ (senescence)
2. เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase ในระยะที่ดอกปทุมมาเกิดการเสื่อมสภาพ
3. เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน ACC synthase และ ACC oxidase
4. เพื่อการยืดอายุของดอกปทุมมาโดยเทคนิค sense และ antisense

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงแบบแผนการแสดงออก บทบาทและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอซีลินในระยะเสื่อมสภาพของดอกปทุมมาและใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาเพื่อยืดอายุในแจกัน (vase life)
2. สิ่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี peer review อย่างเข้มแข็ง
3. บัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท 1 คน
4. เกิดความร่วมมือระหว่างบุคลากรต่างสถาบันในการทำวิจัยที่ยั่งยืน

ตรวจเอกสาร

Ethylene

เอทิลีน เป็นฮอร์โมนพืชที่มีสถานะเป็นก๊าซ มีสูตรโมเลกุลเป็น C_2H_4 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28 ไม่มีสี มีกลิ่น ติดไฟได้ง่าย พบในธรรมชาติ สามารถที่จะถูก oxidised โดย ออกซิเจน โอโซน และ คาร์บอนไดออกไซด์ เอทิลีนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญต่างๆ เช่น การควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth and development) การงอกของเมล็ดพืช (germination of seeds) การออกดอก (flowering) การสุกแก่ของผลไม้ (fruit ripening) การตอบสนองต่อสภาวะเครียด (stress) ทั้งแบบ biotic และ abiotic เช่น ภาวะการขาดออกซิเจน (hypoxia) (Cohen and Kende, 1986) ภาวะแล้ง (drought) (Osborne, 1989) ภาวะที่เกิดจากการบุกรุกของจุลินทรีย์ (Toppin and Esquerre-Tugaye, 1984) และการเสื่อมสภาพของดอกไม้ (flower senescence) รวมทั้งการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการสุกของผลไม้ (Mattoo and Suttle, 1991; Deikman, 1997) เป็นต้น

การสังเคราะห์เอทิลีน

การสังเคราะห์เอทิลีนในพืชชั้นสูง จะเริ่มจาก methionine ซึ่งเป็น amino acid ชนิดหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็น s-adenyl-methionine (AdoMet) โดยเอนไซม์ AdoMet synthetase จากนั้น AdoMet จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) โดยการทำงานของเอนไซม์ ACC synthase (Adams and Yang, 1979) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการสังเคราะห์เอทิลีนในขั้นสุดท้ายของการสังเคราะห์ เอทิลีน ACC จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทิลีนโดยเอนไซม์ ACC oxidase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์เอทิลีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่พืชมีการสะสมเอทิลีนในปริมาณสูง (Holdsworth *et al.*, 1988; Kim and Yang, 1994)

การกำหนดการผลิตเอทิลีน(Brady and Speirs, 1991)

ในผลไม้ส่วนใหญ่ มีการผลิตเอทิลีนมากขึ้นเมื่อมี ACC เพิ่มขึ้น ซึ่งในกรณีนี้การผลิตเอทิลีนถูกกำหนดโดยอัตราการสังเคราะห์ ACC โดยกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase แต่ในผลไม้บางชนิดในระยะพัฒนาการเพิ่มขึ้นของ ACC ไม่มีผลในการเพิ่มการผลิตเอทิลีน โดยคาดว่าในเนื้อเยื่อมี ethylene-forming enzyme(EFE) ไม่เพียงพอที่จะใช้ประโยชน์จาก ACC ที่เพิ่มขึ้น โดยปกติความเข้มข้นของ ACC เพิ่มขึ้นอย่างมากในผลที่สุกจัด ทำให้รู้ว่าการสังเคราะห์ ACC มีมากกว่าอัตราของการใช้ประโยชน์โดย EFE การสังเคราะห์เอทิลีนในผลไม้ อาจถูกกำหนดโดย ACC synthase หรือกิจกรรมของ EFE หรือทั้งสองอย่าง แต่ ACC synthase มีความสำคัญมากกว่า EFE ใน metabolic pathway และเกิดการสะสมอย่างรวดเร็วเมื่อการสังเคราะห์เอทิลีนถูกกระตุ้น และเสื่อมสลายอย่างรวดเร็วเมื่อถูกชักชวน ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นของเอนไซม์ควบคุม

การตอบสนองของดอกไม้ต่อเอทิลีน(นิริยาและคณะ, 2537)

ดอกไม้แต่ละชนิดตอบสนองต่อเอทิลีนในระดับความไวที่แตกต่างกัน เมื่อเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพจะมีความไวต่อการตอบสนองเอทิลีนเพิ่มขึ้น เป็นที่คาดกันว่าความไวต่อการตอบสนองต่อเอทิลีนขึ้นอยู่กับปริมาณของ receptor ที่เฉพาะในเนื้อเยื่อ ดอกไม้บางชนิดมีการตอบสนองต่อเอทิลีนได้สูงที่ความเข้มข้นของเอทิลีน 1-3 ppm. ในเวลา 24 ชั่วโมง ดอกไม้ชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันมีความไวในการตอบสนองต่อเอทิลีนไม่เท่ากัน และมีลักษณะความเสียหายแตกต่างกัน ผลกระทบของเนื้อเยื่อดอกไม้ต่อการทำงานของเอทิลีนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ของความเข้มข้นของเอทิลีน ความเข้มข้นของเอทิลีนในเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาซึ่งเป็นสัญญาณควบคุม (controlling signal) และสามารถบ่งชี้ได้โดยวัดอัตราการสังเคราะห์เอทิลีน ศึกษาเมแทบอลิซึม และวัดอัตราการแพร่กระจายของเอทิลีนไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ และบริเวณภายนอกดอก

การผลิตเอทิลีนและการเสื่อมสภาพของดอกไม้

ปรากฏการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นหลังการถ่ายละอองเรณูของดอกไม้หลายชนิด คือการผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก การเสื่อมสภาพ หลุดร่วงของอวัยวะต่างๆ ของดอกไม้ การเจริญและพัฒนาของรังไข่ (O'Neill, 1997)

Nichols (1966 อ้างโดย มณีนี, 2544) พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอทิลีน มีผลต่อการเสื่อมสภาพของดอกคาร์เนชั่น โดยเริ่มสังเคราะห์เอทิลีน ในช่วง 20-40 วันหลังดอกบาน ดอก *Cyclamen persicum* พันธุ์ Mill ที่ไม่ได้รับการถ่ายละอองเรณูมีการผลิตเอทิลีนในปริมาณต่ำจนกระทั่งดอกเหี่ยว แต่ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอทิลีนอย่างรวดเร็ว เมื่อมีการถ่ายละอองเกสรภายในเวลา 4 วัน (Halevy et al., 1984)

กล้วยไม้ตระกูลหวายสายพันธุ์ Pompadour มีการผลิตเอทิลีนสูงสุดหลังดอกบานเต็มที่ 3 สัปดาห์ และสัมพันธ์กับการสะสมสาร ACC ที่ตรวจวัดได้ในเนื้อเยื่อส่วนดอก ทำให้เกิดการม้วนงอของกลีบดอกและเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพ เมื่อให้สาร ACC จากภายนอกขณะที่ดอกบานเต็มที่ทำให้เร่งการเสื่อมสภาพ และการร่วงของดอกกล้วยไม้ให้เร็วขึ้น (Nair และ Tung, 1987)

Itzhaki และคณะ (1994 อ้างโดย มณีนี, 2544) ได้โคลนยีน *glutathione-s-transferase (GST1)* ของดอกคาร์เนชั่นในระหว่างการเสื่อมสภาพ และศึกษา DNase I footprinting พบว่าตำแหน่งที่ 5' flanking region ของยีน *GST1* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5' GTG ATT TAC CAC CTA TTT CAA G 3' เป็นตำแหน่งที่เข้ามาเกาะของโปรตีนที่แยกได้ในช่วงที่กลีบดอกกำลังเสื่อมสภาพ และดอกที่ได้รับเอทิลีน Maxon และ Woodson (1996) ได้โคลนยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน carnation ethylene responsive element binding protein (CEBP-1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกาะกับปลาย 5' flanking region ของยีน *GST1* และแสดงออกที่บริเวณกลีบดอก ก้านชูเกสรตัวเมีย และรังไข่ โดยปริมาณของ mRNA ที่สะสมจะลดลงเมื่อกลีบดอกเกิดการเสื่อมสภาพ

ดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์ที่ได้รับการผสมเกสรเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว สามารถสังเกตเห็นได้หลังผสมเกสรประมาณ 15 ชั่วโมง มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase และปริมาณของ ACC ในส่วนของเส้าเกสรรวมกับก้านดอกย่อยเพิ่มขึ้นมากกว่าในส่วนของกลีบ

โดยรวมกับกลีบเลี้ยง และการผสมเกสรยังทำให้ดอกกล้วยไม้มีความไวต่อเอทิลีนเพิ่มขึ้น เป็นสาเหตุทำให้ดอกกล้วยไม้หวายปอมปาดัวร์เกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้รูปแบบการผลิเอทิลีนยังแตกต่างกันโดย ACC ทำให้ดอกผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้นในระยะแรกๆ หลังการผสมเกสรเท่านั้น แต่เอทิลีนที่เกิดจากการผสมเกสรนั้นเกิดช้ากว่าและมีอัตราการผลิตมากกว่า และต่อเนื่องนานกว่า (อดิเรก, 2540)

การแสดงออกของยีน ACC oxidase และ ACC synthase ในดอกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส พบว่าการถ่ายละอองเรณูชักนำการสร้างเอทิลีนในยอดเกสรเพศเมียและรังไข่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase ทำให้เกิดการสังเคราะห์เอทิลีนแบบ autocatalytic เพิ่มขึ้นภายใน 12-14 ชั่วโมง ทำให้แผ่นปากม้วนงอ เกิดการเสื่อมสภาพของกลีบดอกภายในเวลา 2 วัน (มณีนี, 2544)

1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS)

Oeller และคณะ (1991) ใช้เทคนิคการถ่ายยีน antisense RNA ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase ในมะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมีการสังเคราะห์เอทิลีนลดลง 99.5% ตรวจพบการแสดงออกของยีน ACC synthase และ ACC oxidase หลังจากได้รับการผสมเกสรและในระหว่างเกิดการเสื่อมสภาพของกลีบดอกมะเขือเทศ (Immaculada et al., 2000)

มีการศึกษาขึ้นที่ควบคุมการสังเคราะห์ ACC synthase ในพืชหลายๆชนิด ตั้งแต่การโคลนยีน ACC synthase โดยการสร้าง cDNA library จาก zucchini (*Cucurbita*) ผลมะเขือเทศ แดง แอปเปิ้ล คาร์เนชั่น ถั่วเขียว และ Arabidopsis พบว่าพืชต่างๆ เหล่านี้มียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ ACC synthase ที่แตกต่างกัน แสดงว่ายีน ACC synthase เป็น family gene คือมียีนมากกว่า 1 ยีน ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ACC synthase และมีการแสดงออกเมื่อได้รับสัญญาณกระตุ้น (signal) ต่างๆ เช่น การได้รับสารจากภายนอก(เอทิลีน, cycloheximide, indoleacetic acid, cyanide, lithium chloride และ ozone) การเกิดบาดแผล(wounding) (Kevin L. et al., 2002)

กล้วยไม้หวายพันธุ์ชาร์ดิฟพลอยด์ (2N) มีอัตราการผลิตเอทิลีนมากกว่าดอกกล้วยไม้หวายเตตราพลอยด์ (4N) ดอกตูมมีการผลิตเอทิลีนสูงสุด ซึ่งอัตราการผลิตเอทิลีนมีความสัมพันธ์

กับปริมาณ ACC และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase เมื่อให้สารละลาย ACC จากภายนอกพบว่า มีอัตราการผลิตเอทิลีนมากกว่าดอกที่ได้รับน้ำกลั่น และเมื่อให้สารละลาย AOA ซึ่งเป็นสารยับยั้งการ ผลิตเอทิลีนทำให้ลดอัตราการสร้างเอทิลีน ปริมาณ ACC และกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase (อภิวรา, 2542)

การศึกษาการแสดงออกทำให้รู้ว่าการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase เป็นผลมา จากการเพิ่มขึ้นของ ACC synthase mRNAs ในระหว่างเกิดการเสื่อมสภาพของดอกและหลังจากการ ผสมเกสร รวมทั้งการได้รับสิ่งเร้า เช่น ออกซิน LiCl ในดอกคาร์เนชั่น การแสดงออกของ DCACS2 และ DCACS3 เกิดขึ้นก่อนที่เกสรตัวเมีย ขณะที่ DCACS1 มีความเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของกลีบ ดอกที่ควบคุมโดยเอทิลีน ซึ่งทั้ง 3 ยีนมีความคล้ายคลึงกับยีน ACC synthase ที่แยกได้จาก Arabidopsis มะเขือเทศ และถั่ว mung bean (Michelle L. and William R., 1999)

มณีนี และคณะ (2544) ศึกษาการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน ACC oxidase และ ACC synthase ในกล้วยไม้พบว่าบางส่วนของ ACC oxidase มีขนาด 365 เรซิดิว และ ACC synthase ที่สมบูรณ์ขนาด 445 เรซิดิว โดย ACC oxidase ของออนซิเดียมมีองค์ประกอบที่ คล้ายคลึงกับกล้วยไม้สกุล Doritaenopsis และกล้วยไม้สกุลหวายคิดเป็นร้อยละ 81 และ 79 ตามลำดับ และ ACC synthase มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดเดียวกันของกล้วยและข้าวสาลีคิดเป็นร้อยละ 68 และ 64 ตามลำดับ

ACC oxidase (ACO)

Wim H. และคณะ (1999) พบว่าออกซิเจนที่ระดับต่ำจะทำให้ระดับของ ACC oxidase mRNAs เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ระดับของ ACC oxidase protein เพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าโปรตีนนี้จะทำงานได้น้อยเมื่อระดับ ออกซิเจนต่ำ การสร้างเอทิลีนของ *Rumex palustris* ในขณะที่ทำการแช่ในน้ำถูกควบคุมโดยระดับของ เอนไซม์ ACC oxidase ที่เพิ่มขึ้นเพื่อถ่วงดุล (counterbalance) กับการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ และการแสดงออกของยีน RP-ACO1 จะพบในก้านใบที่มีการยึดตัวของเนื้อเยื่อขณะแช่อยู่ในน้ำ ถาวรช และคณะ (ม.ป.ป.) ทำการโคลนยีน ACC oxidase (ACO) และ Ethylene receptor (ETR) ใน กล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้า โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิดจากเอ็มอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) พบว่ายีน ACO ที่สังเคราะห์ได้จากส่วนอนุรักษ์มี

ขนาด 800 คูเบต ดีเอ็นทีโคลนได้มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกล้วยไม้สกุลโคริแทนอปซิส และฟาแลนนอปซิสคิดเป็น 90% และมีการแสดงออกที่ปากดอก ขึ้น *ETR* มีขนาด 900 คูเบต ดีเอ็นทีโคลนได้มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม และฟาแลนนอปซิสคิดเป็น 84% และ 83% ตามลำดับ

สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

เวลา	เริ่มดำเนินการ	เดือน ตุลาคม 2549
	เสร็จสิ้น	เดือน กันยายน 2550
สถานที่	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	

อุปกรณ์การทำวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่ (*Curcuma* spp.)

2. วัสดุและอุปกรณ์

- 2.1 เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 37 °C (Mettler, Germany)
- 2.3 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.4 Adjustable automatic pipette และ white, yellow และ blue tip
- 2.5 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml, Multi Ultra PCR tube (Sorenson Bioscience, Inc., U.S.A.)TM และ centrifuge tube
- 2.6 เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
- 2.7 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์โทรโฟนีซิสชนิดแนวนอน (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.8 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์โทรโฟนีซิสชนิดแนวตั้ง (Sequi-Gen GT, Sequencing cell ; (BIO-RAD, U.S.A.)[®])
- 2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply; (BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.10 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD, U.S.A.)
- 2.11 เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer)
- 2.12 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- 2.13 เครื่องเขย่า (shaker)
- 2.14 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
- 2.15 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ 4°C, -20°C และ -80 °C
- 2.16 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
- 2.17 เครื่อง electroporator
- 2.18 คิวเวต (cuvette)
- 2.19 เครื่องผสม (vortex)
- 2.20 เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
- 2.21 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 2.22 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

- 2.23 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
- 2.24 ชุดโม่บดตัวอย่าง (mortar and pestle)
- 2.25 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) เพลท (plate) spreader ฯลฯ
- 2.26 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ซ้อนดักสาร กระดาษขังสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipe[®] tissue) ฟลอยด์อะลูมิเนียม ถังพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระจกพาราฟิล์ม ปากกิบ ถุงมือ ก่อ้งโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ถาดพลาสติกกันตื้น ฯลฯ
- 2.27 กล้องจุลทรรศน์

3. สารเคมี

- 3.1 Liquid nitrogen
- 3.2 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)
- 3.3 RevertAid[™]First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferment, U.S.A.)
- 3.4 QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.)
- 3.5 Inst/Aclone[™]PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A.)
- 3.6 Sodium chloride (NaCl)
- 3.7 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
- 3.8 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)
- 3.9 Chloroform
- 3.10 Isopropanal
- 3.11 Ethyl alcohol (EtOH)
- 3.12 RNaseONE[™] ribonuclease (Promega, U.S.A.)
- 3.13 PCR buffer (Fermentas, U.S.A.)
- 3.14 Magnesium chloride (MgCl₂) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.15 Deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTPs) (Fermentas, U.S.A.)
- 3.16 Primers (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
- 3.17 Taq DNA polymerase (Fermentas, U.S.A.)
- 3.18 GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder (Fermentas, U.S.A.)

- 3.19 Ampicillin
- 3.20 Glycerol oil
- 3.21 Restriction enzyme (*EcoRI*; Fermentas, U.S.A.)
- 3.22 pGEM[®] T Easy Vector (Promega, U.S.A.)
- 3.23 T4 DNA Ligase (Sigma, U.S.A.)
- 3.24 Ligase Buffer (Promega, U.S.A.)
- 3.25 Deionize H₂O (dH₂O)
- 3.26 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.27 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.28 Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 3.29 Potassium acetate
- 3.30 Bromophenol blue
- 3.31 Xylene cyanol FF
- 3.32 Sucrose
- 3.33 Boric acid
- 3.34 Tris base
- 3.35 Ethidium bromide
- 3.36 Agarose
- 3.37 Agar
- 3.38 Tryptone
- 3.39 Yeast extract
- 3.40 Dideoxyribonucleotide triphosphate (d/ddNTPs) (Promega, U.S.A.)
- 3.41 DNA sequencing 5X buffer (Promega, U.S.A.)
- 3.42 Ultrapure water
- 3.43 DNA sequencing Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
- 3.44 DNA Sequencing Stop Solution (Promega, U.S.A.)
- 3.45 Acrylamide
- 3.46 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
- 3.47 Urea

- 3.48 3-(Trimethoxysilyl),propylmethacrylate (Bind Silane) (sigma, U.S.A.)
- 3.49 Clear view (Dietham Trading Co.,Ltd, Thailand)
- 3.50 Ammonium persulphate (APS)
- 3.51 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)(BIO-RAD, U.S.A)
- 3.52 Glacial acetic acid
- 3.53 Silver nitrate (AgNO_3)
- 3.54 37% Formaldehyde (HCHO)
- 3.55 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 3.56 Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- 3.57 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)
- 3.58 Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)
- 3.59 N,N' -dimethyl-formamide

วิธีการวิจัย

วิธีการทดลอง การทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่อไปนี้

1. การเตรียมอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.1. การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำกลีบดอกของปทุมมา มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างใน aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.2. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA)

1.2.1. นำตัวอย่างที่บดละเอียด 50-100 mg ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่มี

TRIZOL[®] Reagent ปริมาตร 1 ml ผสมตัวอย่างกับ reagent โดยวิธี vortex และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

1.2.2. เติม chloroform ปริมาตร 0.2 ml พลิกหลอดกลับขึ้นมาเบาๆ นาน 15 วินาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที

1.2.3. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (aqueous phase) ใส่หลอดใหม่

1.2.4. เติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 0.5 ml พลิกหลอดกลับขึ้นมาจากนั้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

1.2.5. นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$ เทส่วนใสด้านบนทิ้งไปเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นล้างตะกอน โดยเติม 75% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 7,500 g นาน 5 นาที ที่ $2-8^{\circ}\text{C}$

1.2.6. นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (Rnase-free water) ปริมาตร 20 μl

1.2.7. ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย 1.4% denaturing formaldehyde agarose/EtBr electrophoresis โดยจะสังเกตเห็นแถบ 28S และ 18S ribosomal RNA

2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid™First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A.)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอน เอทั้งหมด 0.1-5 μ g , oligo(dT) primer 0.5 μ g และ deionized water ให้ครบ 12 μ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 70°C นาน 5 นาที จากนั้นแช่หลอดบนน้ำแข็งแล้วเติม 1xreaction buffer, RiboLock™Ribonuclease inhibitor 20 Unit/reaction และเติม dNTPs 1 mM (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C นาน 5 นาที จากนั้นเติม RevertAid™M-MuLV Reverse Transcriptase 200 Unit/reaction บ่มที่ 42°C นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่ 70°C นาน 10 นาทีเก็บ First Strand cDNA ไว้ที่ -70°C

3. การสังเคราะห์ 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene (*acs*) และ 1-aminopropane-1-carboxylate oxidase gene (*aco*) ด้วยเทคนิค RT-PCR

3.1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบ Primer โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ (Conserved domain) ของ *acs* gene และ *aco* gene จาก Dianthus, Fragaria, Cymbidium, Ipomoea, Petunia, Lilium, Prim.cons. แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการแยก *acs* gene และ *aco* gene จากดอกปทุมมา ด้วยเทคนิค RT-PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'  3')
ACS Forward primer*	AT(TCA) CA(AG) ATG GG(TCAG) TT(AG)/CT(TCAG) GC(TCAG) GA(AG) AA(CT) CA(AG)
ACS Reverse primer*	AT(TC) TC(TCAG) TG(TC) AT(TC) CC(TCAG) TT(AG)/CT(TCAG) GG(TCAG) AT(TCAG)
ACO Forward primer*	GCTTGTSARAAYTGGGGYTTSTWYG
ACO Reverse primer*	CATCGCCTCRAAYCKYGGYTCTYTT

* สังเคราะห์โดยบริษัท Operon Technology, Alamada, U.S.A

3.2. องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 mM MgCl₂, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อย่างละ 200 μ M, ไพริเมอร์ 0.5 μ g, Taq DNA polymerase 2.5 Unit/reaction และ 1 cDNA (DNA template) 40 ng ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionize water จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณ 1 cDNA ด้วยเครื่อง PCR

3.3. เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT-PCR แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR

อุณหภูมิ	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	4°C
ระยะเวลา	2min	15 sec	15 sec	30 sec	10 min	α
จำนวนรอบ	← 30 รอบ →					

3.4 การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

3.4.1 เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1xTBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50°C ทำความสะอาดถาดเจล และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก

3.4.2 วางหัวเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ

3.4.3 เท agarose ลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

3.4.4 เททับผิวหน้าของเจลด้วย 1xTBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหัวเสียบออก

3.4.5 นำเอา agarose gel ออกจากบล็อกแล้ววางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หัวเสียบอยู่ทางขั้วลบ

3.4.6 เท 1xTBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1xTBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร

3.4.7 ผสม 1 x loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของ agarose gel

3.4.8 ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ใกล้ปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างถาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.4.9 ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน

3.4.10 นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้

3.4.11 ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก (elute)

3.5 การ clone ชิ้นส่วน *acs* gene และ *aco* gene (pGEM-T-Easy, Promega)

3.5.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 μ l ประกอบด้วย plasmid vector pGEM-Teasy (ภาคผนวก) 0.165 μ g, purified PCR fragment 0.54 pmol, 1xligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22°C นาน 12 ชั่วโมง

3.5.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™ Bacterial Transformation System

3.5.3 เตรียม *E.coli* สายพันธุ์ DH5- α โดยเลี้ยงเซลล์ใน TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 ml จากนั้นเขย่าที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

3.5.4 เดิมเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยง 12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™ C-Medium จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

3.5.5 ปุ่ม LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 °C อย่างน้อย 20 นาที

3.5.6 เตรียม TransformAid™ T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ในปริมาณ 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™ T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง

3.5.7 เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 20 นาทีโดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที

3.5.8 ที่ส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 300 µl จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

3.5.9 centrifuge เซลล์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด 4 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นที่ส่วนใส

3.5.10 resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 120 µl จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

3.5.11 เตรียม ligation mixture โดยแบ่งใส่ eppendorf ขนาด 1.5 ml หลอดละ 15 µl และวางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที

3.5.12 เติมเซลล์ที่แขวนลอยปริมาตร 60 µl ในแต่ละหลอดของ ligation mixture จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

3.5.13 Plate เซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นปุ่มเซลล์ที่ 37°C นาน 12 ชั่วโมง

3.6 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

3.6.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline (T.Manias et., al 1982)

3.6.1.1 เลือกโคโลนีสีขาวจาก LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยเลี้ยงใน LB-Ampicillin both ที่ 37 °C เขย่านาน 12 ชั่วโมง

3.6.1.2 นำเชื้อ 1.5 ml ใส่ลงใน microtube ปั่นที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่ส่วนใส เก็บเฉพาะตะกอนเซลล์

3.6.1.3 นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 µl vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 µl และกลับหลอดไปมาเบาๆ 4 ครั้ง และเติม solution III (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 µl เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นตะกอนสีขาวๆ เกิดขึ้นแช่ต่อน้ำแข็งอีก 10 นาที

3.6.1.4 นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส

- 3.6.1.5 ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที และแยกเอาตะกอนพลาสติกมาละลายด้วย 0.05 M Tris, 0.1 M NaOAc (pH 8)
- 3.6.1.6 เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส เขย่าให้เข้ากันนำไปไว้ที่ -20°C นาน 30 นาที และปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 10 นาที
- 3.6.1.7 ทิ้งส่วนใส และนำตะกอนพลาสติกล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 μl จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 rpm ที่ 4°C นาน 5 นาที
- 3.6.1.8 นำตะกอนพลาสติกมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 μl
- 3.6.1.9 ตรวจสอบพลาสติกโดยการทำ agarose gel electrophoresis

3.6.2 การตรวจสอบพลาสติกโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme) เตรียมสารละลายปริมาตร 20 μl ซึ่งประกอบด้วย 1x *EcoRI* buffer, plasmid 2 μg , เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* 15 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย sterile water จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C นาน 12 hr ตรวจสอบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยทำ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับแทปคี่เอ็นเอมาตรฐาน (Molecular Marker)

4. การสร้างและส่งถ่ายชุดยีนเข้าสู่ปทุมมาและยาสูบ

- 4.1 ย้ายยีนสังเคราะห์เอนไซม์ ACC synthase และ ACC oxidase เข้าสู่ Ti plasmid (pBI121 หรือ p35S GFP) โดยเวกเตอร์ จะมี marker gene คือ *gus* และ *gfp* ภายใต้การทำงานของ 35S promoter ในทิศทาง sense และ antisense ตามลำดับ
- 4.2 ส่งถ่าย recombinant plasmids จากข้อ 14.3.1 เข้าสู่เนื้อเยื่อของต้นยาสูบและปทุมมาโดยวิธี Agrobacterium-mediated transfer (Raineri et al., 1990)
- 4.3 คัดเลือก transgenic plants ในระยะแรกโดยคัดเลือกจากการแสดงออกของ antibiotic resistance genes แล้วชักนำให้ เป็นต้นอ่อนโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้น ตรวจสอบการแสดงออกของ *gus* และ *gfp* gene และเทคนิค PCR
- 4.3.4 ตรวจสอบการเข้าร่วมของ gene ที่สังเคราะห์ ACC synthase และ ACC oxidase ในจีโนมของยาสูบและปทุมมาโดยวิธี RT-PCR

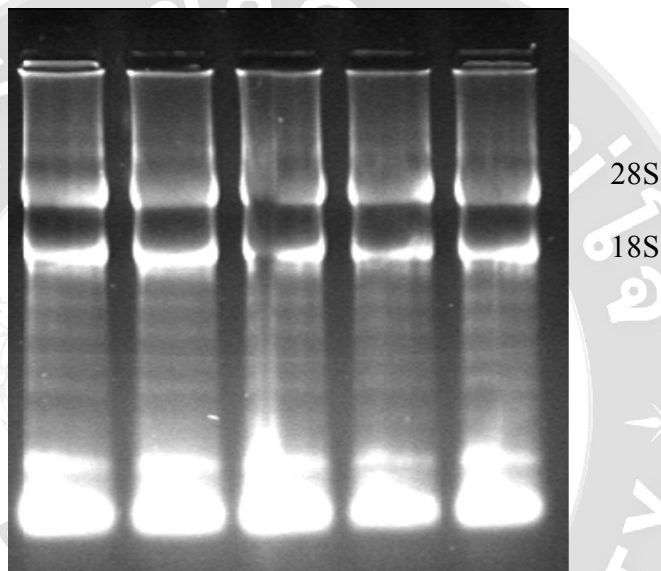
4.3.5ชักนำให้ transgenic plant เกิดเป็นต้น แล้วติดตามดูผลของยีนที่แสดงออก (phenotype)



ผลการทดลอง

1. การสกัด Total RNA จากดอกปทุมมาโดยใช้ TRIZOL[®] Reagent

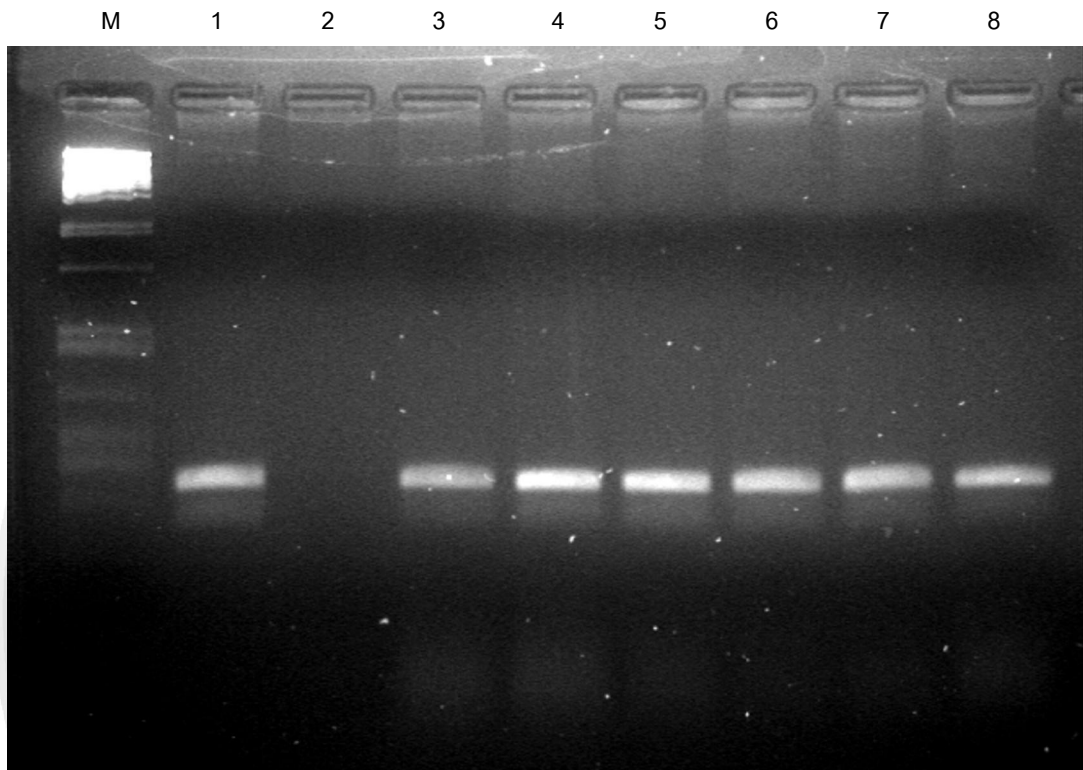
ผลการแยก RNA จากดอกและใบปทุมมาที่สกัดได้ โดยวิธี Agarose gel Electrophoresis
ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 : แสดงผลการสกัด Total RNA จากดอกปทุมมา

2. การแยก 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene (*acs* gene) ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *ACS* จากเอ็มอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบ และดอกปทุมมาที่ไม่ถูกตัดและที่ถูกตัดออกจากต้นในระยะ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ชั่วโมง พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 492 คู่เบส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 : แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ด้วย degenerated primer ของยีน *ACS*

M: Lamda DNA/*Pst*I, 1,3-8: ชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ mRNAs template จากดอกปทุมมาที่ตัดออกจากต้นที่ชั่วโมงที่ 0 1 2 3 4 5 และ 10 ตามลำดับ, 2: ชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการทำ RT-PCR โดยใช้ mRNAs template จากใบปทุมมา

3. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *ACS* จากปทุมมากับฐานข้อมูล Genbank ยีน *ACS* ที่แยกได้มีกรดอะมิโน 164 กรดอะมิโน ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้

Amino acid Sequence

IQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNP KASICTNDGIESFRRIANFQDYH
GLPEFTNAIAKFM EKTRGVKVKF DAKRVVMAGGATCANETLILC
LADPADAF LVPTPYYPGFNRDLRWRSGVQLLPISCKSCNNFKITIE
AIEEAYEKGQQANVKIKGLILTNP CNPLGT

ภาพที่ 4 : การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACS ในดอกปทุมมา

Accession #	Plant species	Amino acid size	%Amino acid similarity
P29535	<i>Lycopersicon esculentum</i>	476	98
B2NIX2	<i>Capsicum chinense</i>	486	77
Q5VJV3	<i>Nicotiana attenuata</i>	490	77
Q6EHI3	<i>Solanum lycopersicum</i>	485	76
P94005	<i>Solanum lycopersicum</i>	477	76

CaACS
sp|P29535|1A14_SOLLC
tr|B2NIX2|B2NIX2_CAPCH
tr|Q5VJV3|Q5VJV3_9SOLA
tr|Q6EHI3|Q6EHI3_SOLLC
tr|P94005|P94005_SOLLC

---IQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNP KASICTNDGIESFRRIANFQDYHG
NGVIQMGLAENQLSVDLIEEWIKRNP KASICTNDGIESFRRIANFQDYHG
NGVIQMGLAENQLCFDLIEEWIKRNP KASICSNEGIKSFKAIANFQDYHG
NGVIQMGLAENQLCFDLIEEWIKRNP NASICTTEGIKSFRAIANFQDYHG
NGVIQMGLAENQLCLDLIEDWIKRNP KGSICS-EGIKSFKAIANFQDYHG
NGVIQMGLAENQLCLDLIEDWIKRNP KGSICS-EGIKSFKAIANFQDYHG
*****..****:*****:****: :***: : *****

CaACS
sp|P29535|1A14_SOLLC
tr|B2NIX2|B2NIX2_CAPCH
tr|Q5VJV3|Q5VJV3_9SOLA
tr|Q6EHI3|Q6EHI3_SOLLC
tr|P94005|P94005_SOLLC

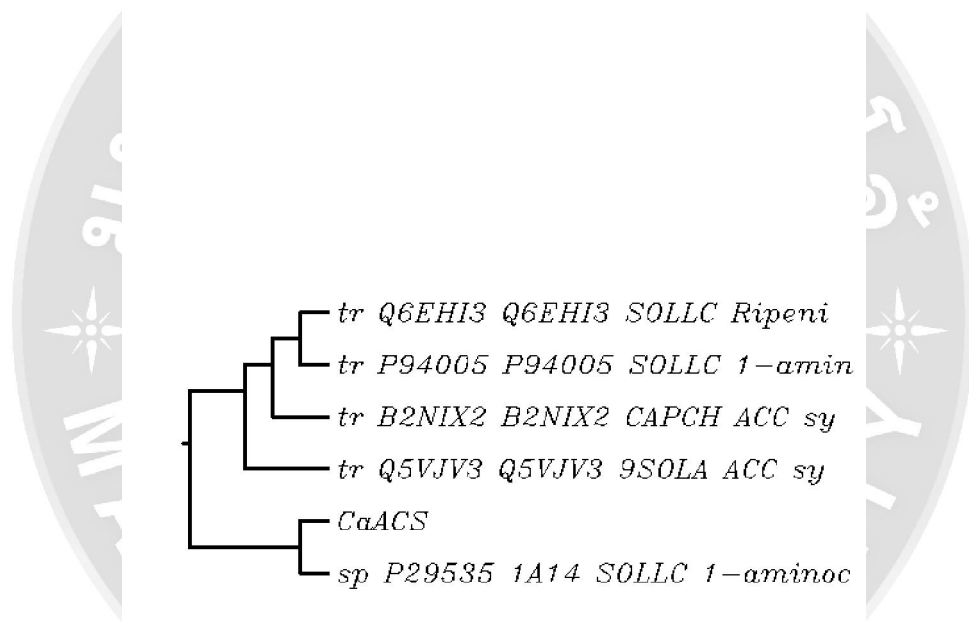
LPEFTNAIAKFM EKTRGVKVKF DAKRVVMAGGATCANETLILCLADPADA
LPEFTNAIAKFM EKTRGGKVKF DAKRVVMAGGATGANETLILCLADPGDA
LPEFRRAIAKFM EKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANESIIFCLADPGDA
LPEFRRAIAKFM EKTRGERVTFDPERVVMAGGATGANETIIFCLADAGDA
LPEFRKAIKFM EKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANETIIFCLADPGDA
LPEFRKAIKFM EKTRGGVRVFDPERVVMAGGATGANETIIFCLADPGDA
****.***** : * **.:***** ***: :*:****..**

CaACS
 sp|P29535|1A14_SOLLC
 tr|B2NIX2|B2NIX2_CAPCH
 tr|Q5VJV3|Q5VJV3_9SOLA
 tr|Q6EHI3|Q6EHI3_SOLLC
 tr|P94005|P94005_SOLLC

FLVPTPYYPGFNRDLRWRSQVQLLPISCKSCNNFKITIEAIEEAYEKQQ
 FLVPTPYYPGFNRDLRWRSQVQLLPISCKSCNNFKITIEAIEEAYEKQQ
 FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFQITAKAVKEAYENAQK
 FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIPCDSSNNFQITKAVNEAYENAQK
 FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFKITSKAVKEAYENAQK
 FLVPSPYYPAFNRDLRWRTGVQLIPIHCESSNNFKITSKAVKEAYENAQK
 ****:****.*****:****:* *.*.***:* * :*:****.:*:

CaACS
 sp|P29535|1A14_SOLLC
 tr|B2NIX2|B2NIX2_CAPCH
 tr|Q5VJV3|Q5VJV3_9SOLA
 tr|Q6EHI3|Q6EHI3_SOLLC
 tr|P94005|P94005_SOLLC

ANVKIKGLILTNPCNPLGT-----
 ANVKIKGLILTNPCNPLGTILDRDTLKKISTFTNEHNIHLVCDEIYAATV
 SNIKVKGLILTNPSNPLGTTLDKHTLKSLLNFTNQHNHLVCDEIYAATV
 SNIKVKGLILTNPSNPLGTTILDRDTLKNFLTFTNQHNHLVCDEIYAATV
 SNIKVKGLILTNPSNPLGTTLDKDTLKSVLSTNQHNHLVCDEIYAATV
 SNIKVKGLILTNPSNPLGTTLDKDTLKSVLSTNQHNHLVCDEIYAATV
 :*:****.*****:****:



4. การแยก 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene (*aco* gene) ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน *ACO* จากเอ็มอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบ และดอกปทุมมาที่ไม่ถูกตัดและที่ถูกตัดออกจากต้นในระยะ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 ชั่วโมง พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 366 คู่เบส (ภาพที่)

5. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *ACO* จากปทุมมากับฐานข้อมูล Genbank ยีน *ACO* ที่แยกได้มีกรดอะมิโน 122 กรดอะมิโน ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้

Amino acid Sequence

TMKEFALELEKLAERLLDLLCEDLGLEKGYLKRVFCGGSDGLPTF
GTVKVSNYPPCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDKVSGLQLLKD
GEWVDVPPMRHSIVVNIGDQLEVITNGRYKSVMHRVVAQTNGNR
MSIASFYNPGRSD

ภาพที่ 6 : การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACO ในดอกปทุมมา

Accession #	Plant species	Amino acid size	%Amino acid similarity
A4UTQ4	Dendrobium hybrid cultivar	314	83
B0FYC6	Sophrholaeliocattleya 'Love Castle'	291	80
A0ABY7	Cymbidium hybrid cultivar	324	80
Q9ZQZ1	<i>Dendrobium crumenatum</i>	318	80
Q6PL00	Cattleya bicolor	325	79

CaACO
tr|A4UTQ4|A4UTQ4_9ASPA
tr|B0FYC6|B0FYC6_9ASPA
tr|A0JBY7|A0JBY7_9ASPA
sp|Q9ZQZ1|ACCO_DENCR
tr|Q6PL00|Q6PL00_9ASPA
-----TMKEFALELEKLAERLLDLLCEDLGLEKGYLK
LPTSNISQIPDLDEDCRSTMKEFALELEKLAERLLDLLCEDLGLEKGYLK
LPTSNISQIPDLDEDCRSTMKEFALELEKLAERLLDLLCEDLGLEKGYLK
LPTSNISEVVDLDDDCRSTMKEFALEVEKLAESLLDLLCEDLGLEKGYLK
LPTSNISQVVDLDEDCGSTMKEFALGLEKLAERLLDLLCENLGLEKGYLK
LPTSNISQIPDLDEDCRSTMKEFALELEKLAERLLDLLCEDLGLEKGYLK
***** : *****:*****

CaACO
tr|A4UTQ4|A4UTQ4_9ASPA
tr|B0FYC6|B0FYC6_9ASPA
RVFCGGSDGLPTFGTVKVSNYPPCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDKV
RVFCGGSDGLPTFGTVKVSNYPPCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDKV
RVFCGGSDGLPTFGTVKVSNYPPCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDKV

tr|A0JBY7|A0JBY7_9ASPA
 sp|Q9ZQZ1|ACCO_DENCR
 tr|Q6PL00|Q6PL00_9ASPA

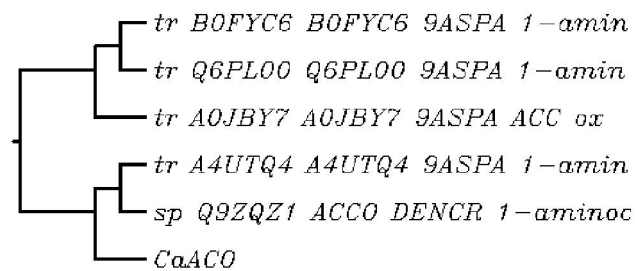
RVFCGSDGLPTFGTKVSNYPCCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDKV
 RVFCGSDGLPTFGTKVSNYPCCPKPELIKGLRAHTDAGGIILLFQDDTV
 RVFCGSDGLPTFGTKVSNYPCCPKPELIKGLKAHTDAGGIILLFQDDKV
 *****:*****.*

CaACO
 tr|A4UTQ4|A4UTQ4_9ASPA
 tr|B0FYC6|B0FYC6_9ASPA
 tr|A0JBY7|A0JBY7_9ASPA
 sp|Q9ZQZ1|ACCO_DENCR
 tr|Q6PL00|Q6PL00_9ASPA

SGLQLLKDGWVDVPPMRHSIVVNIGDQLEVITNGRYKSVMHVRVVAQTNG
 SGLQLLKDGWVDVPPMRHSIVVNIGDQLEVITNGRYKSVMHVRVVAQTNG
 SGLQLLKDGQWIDVPPLRHSIVVNIGDQLEVITNGKYKSVMHVRVVAQTDG
 SGLQLLKDGWVNVPPMRHSIVINIGDQLEVITNGKYKSVLHRVVAQTDG
 SGLQLLKDEEWIDVPPMRHSIVVNIGDQLEVITNGKYKSVMHVRVVAQTNG
 SGLQLLKDGQWIDVPPLRHSIVVNIGDQLEVITNGKYKSVMHVRVVAQTDG
 *****:*.***:*****:*****:*****:*****.*

CaACO
 tr|A4UTQ4|A4UTQ4_9ASPA
 tr|B0FYC6|B0FYC6_9ASPA
 tr|A0JBY7|A0JBY7_9ASPA
 sp|Q9ZQZ1|ACCO_DENCR
 tr|Q6PL00|Q6PL00_9ASPA

NRMSIASFYNPGSD-----
 NRMSIASFYNPGSDAIVFPAPELVEKEAEKKK-EVYPKFVFEDYMKLYV
 NRMSIASFYNPGSDAIVISPAPELVEKEAEKKKETTYPKFVFQDYMNIYI
 NRMSIASFYNPGSDAIVFPAPELVEREAE-KKIETYPKFVFQDYMNIYV
 NRMSIASFYNPGSDAIVFPAPELVEKEAEKKK-ETYPKFVFEDYMKLYV
 NRMSIASFYNPGSDAIVISPAPELVEKEAEKKKEATYPKFVFEDYMKLYI



สรุปผลการทดลอง

จากการโคลนยีน 1-aminopropane-1-carboxylate synthase (ACS) และ 1-aminopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) จากดอกปทุมมา (*Curcuma* spp.) ที่ตัดออกจากต้นในระยะเวลาต่างๆ กัน โดยเทคนิค RT-PCR ได้ชิ้นส่วนยีนมีขนาดประมาณ 492 คู่เบส และ 366 คู่เบส แต่เมื่อใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ จากใบเป็นเทมเพลตไม่พบชิ้นส่วนยีน ACS และ ACO แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่ยีน ACS และ ACO จะเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของดอกปทุมมา จากนั้นโคลนชิ้นส่วนยีนเข้าสู่ pGEM T-Easy vector และคัดเลือกโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยวิธี Blue/White screening และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการหาลำดับของกรณิกวลี และลำดับกรดอะมิโนชิ้นส่วนของยีน ACS เปรียบเทียบกับพีชอื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank พบว่ายีนที่แยกได้จากดอกปทุมมามีลำดับกรดอะมิโนเหมือน *Lycopersicon esculentum* 98% ซึ่งบริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve region)

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายเข้มข้น

1. 10X Tris-borate buffer (10X TBE)

ละลาย Tris- base 108 กรัม Boric acid 55 กรัม และ 0.5mM EDTA(pH8) 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2. Loading buffer

ละลาย 0.25%(w/v)bromophenol blue 0.25%(w/v)xylene cyanol FF และ 40%(w/v) sucrose ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหมอนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.5M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate.2H O(EDTA) จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำ 8 มิลลิตร คนให้ละลายมากที่สุด และปรับให้เป็น pH8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ

4. 1M Tris-HCl, pH8.0

ละลาย Tris- base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ

5. 1% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิตร

6. สารละลาย1 (solution I)

ผสมสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50mM กับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 10mM และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

7. สารละลาย2 (solution II)

ผสมสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้น 200mM กับสารละลาย 1% SDS ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

8. สารละลาย3 (solution III)

ละลาย potassium acetate ในน้ำกลั่น 100 มิลลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสูตร LB(Luria-Bertani medium) ประกอบด้วย

bacto-typtone	10 กรัมต่อลิตร
bacto-yeast extract	5 กรัมต่อลิตร
NaCl	5 กรัมต่อลิตร



ภาคผนวก ข

พลาสมิกเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง คือ pGEM-Teasy ซึ่งมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังรูป

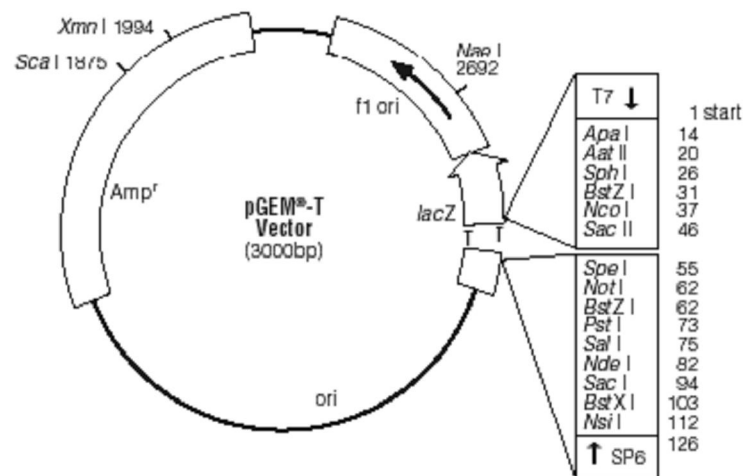


Figure 2. pGEM®-T Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
multiple cloning region	10-113
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
<i>lac</i> operator	185-201
β lactamase coding region	1322 2182
phage f1 region	2365-2820
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2941-2957
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	161-177

ภาพที่ 6 : แผนที่ยีนของ pGEM-Teasy

ที่มา: http://www.bio.unipd.it/.../Lab_Integrato/Lab_Int_3

